

EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE NUTRIENTES Y PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN CEPAS DE LEVADURA COLOMBIANAS Y COMERCIALES

EVALUATION OF THE NUTRIENT CONTENT AND BIOMASS PRODUCTION IN COLOMBIAN AND COMMERCIAL YEAST STRAINS

Nohora Patricia Manovacía Moreno¹; Angélica María Moreno Cárdenas²; Olga Lucía Mayorga Mogollón³; Rolando Barahona Rosales⁴

Resumen. En el presente estudio se evaluó la producción de biomasa, el contenido de algunos nutrientes (selenio, carbohidratos totales y proteína microbiana) y el consumo de sustrato de cepas de levaduras comerciales y nativas pertenecientes al Banco de Germoplasma de la Nación Colombiana, manejado por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. Inicialmente se determinó el crecimiento de tres levaduras nativas seleccionadas al azar bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y tiempo de fermentación usando un medio líquido de extracto de malta. Dentro de estas condiciones, las mejores respuestas se observaron a pH de 4,5, 25 °C y 24 horas de fermentación. Usando estas condiciones se evaluaron 100 accesiones de levaduras nativas y 4 comerciales por su producción de biomasa, contenido de selenio, carbohidratos totales y proteína microbiana y consumo de sustratos. De acuerdo con estas variables y un análisis de conglomerados fue posible agrupar las levaduras en grupos homogéneos. Hubo elevada variabilidad en la producción de biomasa entre las 104 cepas evaluadas, probablemente debido a la variabilidad biológica existente en la población estudiada. Los rendimientos de biomasa variaron entre 0,101 y 0,480 g de biomasa g⁻¹ de azúcar consumido y las velocidades de producción de biomasa oscilaron entre 0,040 y 0,185 g L⁻¹ h⁻¹. El consumo promedio de nutrientes (g de nutrientes consumidos/ g de nutrientes disponibles) fue de 91,6% en el caso de los carbohidratos y de 17,8% en el caso de la proteína. Se identificaron diez cepas de superior crecimiento y contenido de nutrientes, cuyo potencial prebiótico y probiótico será evaluado en futuros ensayos *In vivo*.

Palabras claves: Levaduras, producción de biomasa, selenio, proteína microbiana, carbohidratos totales.

Abstract. In the present study biomass production and nutrient (selenium, total carbohydrate and microbial protein) were evaluated in both commercial and native yeast isolates from the Colombian Germplasm Bank managed by the Colombian Corporation of Agricultural Research, CORPOICA. In an initial phase, three randomly chosen yeast isolates were grown under different conditions of pH, temperature and time of fermentation using liquid malt extract culture medium. The best responses in biomass yield were observed at a pH of 4.5, or temperature of 25 °C and a fermentation period of 24 hours. Using these conditions, 100 native and 4 commercial yeast isolates, were evaluated for their biomass production, content of selenium, total carbohydrates and microbial protein and nutrient intake. According to these variables, a cluster analysis was used to distribute the 104 isolates in homogeneous groups. Great variability in biomass production was observed among isolates, probably due to the existing biological variability in the population studied. Biomass yields varied from 0.101 to 0.480 g of biomass/ g of sugar consumed and rate of biomass production ranged between 0.040 to 0.185 g L⁻¹ h⁻¹. Average nutrient intake (g of consumed nutrients/ g of available nutrients) was of 91.6% in the case of carbohydrates and of 17.8% in the case of protein. Ten yeast isolates with superior growth and nutrient content were identified for future screening for prebiotic and probiotic potential.

Key words: Native yeast isolates, yeast biomass production, selenium, protein, carbohydrates.

En los sistemas pecuarios es frecuente el uso de antibióticos para el control de diferentes patógenos o como promotores del crecimiento de los animales (FEDESA, 1999; Castro y Rodríguez, 2005). Sin embargo, dicho uso ocasiona residualidad en los

productos de consumo humano que puede relacionarse con el surgimiento de resistencia de los patógenos a los antibióticos de uso común en la salud humana (Castro y Rodríguez, 2005).

¹ Joven Investigadora. COLCIENCIAS – Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, CI Tibaitatá, km 14 vía a Mosquera, Cundinamarca, Colombia. <patico1511@gmail.com>

² Joven Investigadora. COLCIENCIAS – Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, CI Tibaitatá, km 14 vía a Mosquera, Cundinamarca, Colombia. <angie1130@gmail.com>

³ Investigadora. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, CI Tibaitatá, km 14 vía a Mosquera, Cundinamarca, Colombia. <lmayorga@corpoica.org.co>

⁴ Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A.A. 1779. Medellín, Colombia. <rbarahonar@unalmed.edu.co>

Recibido: Agosto 22 de 2007; Aceptado: Junio 24 de 2008.

Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín 61(2): 4542-4553. 2008

En muchos países la prohibición del uso de antibióticos en dietas para animales ha contribuido con la creciente aparición en el mercado de varios productos diseñados para reemplazarlos. Así, en el mercado mundial de productos funcionales para la salud de humanos y animales que se estimó recientemente en 50 billones de dólares al año (Hilliam, 2003), la mayor parte está siendo acaparada por productos de carácter prebiótico, probiótico y simbiótico. Con la inclusión de estos en las dietas se pretende aumentar la actividad y el número de especies microbianas benéficas en la flora del tracto intestinal, reducir parcial o totalmente el uso de antibióticos y favorecer el rendimiento animal. Sin embargo, estos nuevos productos son generalmente de alto costo económico lo que limita su uso en los sistemas colombianos de producción animal. Desde esta perspectiva adquiere importancia la realización de estudios que contribuyan con la generación nacional de productos prebióticos y probióticos con efectos positivos demostrados en la producción animal y en el valor agregado de los productos lácteos y cárnicos.

Entre los microorganismos con gran potencial probiótico se encuentran algunas especies bacterianas del género *Lactobacilli* y *Bifidobacteria* y las levaduras. En la comunidad científica ha venido ganando interés el uso de *Saccharomyces boulardii* para controlar los patógenos de la diarrea (*Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae* y *Enterobacteriaceae* (Gismondo *et al.*, 1999; Elmer y McFarland, 2001). El papel de las levaduras, particularmente de *S. cerevisiae*, como probiótico para aves y cerdos, ha recibido la atención de muchos investigadores, con resultados prometedores basados en los efectos probióticos (exclusión competitiva de patógenos) (Nurmi y Rantala, 1973) o en la oferta de minerales como el selenio o el cromo que no son fácilmente disponibles a los animales en sus formas inorgánicas (Zelenka y Fajmonova, 2005). En rumiantes con el suministro de levaduras inactivas y/o levaduras vivas se han registrado aumentos en el consumo (Williams *et al.*, 1991), la ganancia de peso (Yoon y Stern, 1996), la producción de leche (Kellems *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1991; Wohlt *et al.*, 1991; Piva *et al.*, 1993) y mejoras en la composición de la leche (Williams *et al.*, 1991; Wohlt *et al.*, 1991). Estas respuestas han sido atribuidas a un estímulo del crecimiento y de la

actividad de las bacterias celulolíticas y utilizadoras del lactato en el rumen, aumento de la digestión de fibra y en el flujo de la proteína microbiana desde el rumen (Martin y Nisbet, 1992; Newbold *et al.*, 1996).

Estas características hacen que las levaduras sean consideradas microorganismos de gran promesa para cumplir las funciones de probióticos y prebióticos. La gran diversidad de levaduras existentes en Colombia (muchas de las cuales están conservadas en el Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico manejado por CORPOICA) mejora aún mas las perspectivas del uso de esta alternativa.

Los estudios realizados por CORPOICA han reportado el uso efectivo de algunas de estas levaduras en el control biológico de fitopatógenos de poscosecha en frutas y hortalizas (Cotes *et al.*, 2004) y han mostrado ser de gran interés para el control de *Botrytis*, *Rhizopus* y *Alternaria*. Sin embargo, aún no se ha investigado a profundidad su inclusión en la formulación de prebióticos y probióticos para ser utilizados como aditivos en nutrición animal. El presente estudio tuvo como propósito evaluar tanto cepas nativas como comerciales con el fin de identificar aquellas con características promisorias para ser utilizadas en la generación de productos prebióticos y probióticos, contribuyendo a mejorar la competitividad del productor colombiano en el mercado nacional e internacional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de levaduras evaluadas y medios de cultivo. Para el estudio se seleccionaron cien aislados de levaduras nativas pertenecientes al Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico de CORPOICA. Estas levaduras fueron aisladas de muestras de frutas [lulo (*Solanum quitoense* Lam), durazno (*Prunus persica*), curuba (*Passiflora mollissima* HBK Bailey), manzana (*Malus domestica*), pera (*Pyrus communis*), ciruela (*Prunus domestica*) y mora (*Rubus glaucus* Bent)], cebolla (*Allium cepa*), melaza, panela ó suelo provenientes de diferentes regiones de Colombia, principalmente de los departamentos de Boyacá, Antioquia, Cundinamarca y Huila (Sánchez *et al.*, 2000). Como controles se incluyeron cuatro productos comerciales a base de la levadura *Sacharomyces cereviceae*.

De acuerdo con los lineamientos del Laboratorio de Manejo Integrado de Plagas de CORPOICA (Corredor, 2002) y con el fin de garantizar la viabilidad de los aislados, las levaduras se conservaron en agua destilada estéril, en viales que se sellaron herméticamente con tapones de butilo y agrafe de aluminio y se almacenaron a 4 °C. Estos viales se utilizaron como la fuente inicial de inóculo en todos los experimentos relacionados en este estudio.

La activación de los aislados se llevó a cabo en cajas de petri que contenían medio sólido agar/ extracto de malta, con 0,3% de extracto de levadura, 3% de extracto de malta, 1% de dextrosa, 0,5% de peptona y 2% de agar-agar en 1 L de agua. Para el crecimiento de las levaduras se utilizó medio líquido de extracto de malta (YM), de igual composición al medio descrito anteriormente con la diferencia que el extracto de malta se agregó sólo al 0,3%.

La curva de crecimiento se calculó midiendo la absorbancia de los diferentes cultivos a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 y 24 horas) durante incubación en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 601. Con el fin de determinar la longitud de onda que permite medir con mayor precisión el crecimiento las lecturas de absorbancia se realizaron a 540, 570 y 620 nm.

Determinación del efecto de la temperatura, el pH y el tiempo de incubación sobre el crecimiento de las levaduras. En una primera fase se realizó un ensayo con tres aislados de levadura (042, 068 y 155) seleccionados al azar para determinar el efecto de cambios en el pH del medio de cultivo, la temperatura y del tiempo de incubación.

El efecto del pH en el crecimiento de las levaduras se evaluó en dos experimentos. En el primero los aislados 042, 068 y 155 fueron distribuidos en seis tubos de ensayo que contenían medio líquido YM, con diferentes valores de pH de acuerdo con la escala sugerida por Aguirre (2003): 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 y 7,0. Los tubos se incubaron a 25 °C durante 24 horas. Con el fin de corroborar las observaciones del primer experimento en un segundo ensayo se creció el aislado 042 en medio de cultivo con pH de 4,5 y 5,5, a 25 °C durante 30

horas, realizando lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

Para medir el efecto de la temperatura en la cinética de crecimiento, se incubaron las levaduras en medio líquido YM a pH 4,5 a 25, 30 y 35 °C durante 36 horas. El crecimiento se determinó midiendo la absorbancia a 540 nm.

Evaluación de la producción de biomasa y el contenido de nutrientes seleccionados en una colección de levaduras nativas y comerciales.

Para esta evaluación se crecieron los 104 aislados de levaduras (100 nativas, 4 comerciales) bajo las condiciones en que en la fase preliminar se obtuvieron los mayores rendimientos de biomasa con los aislados 042, 068 y 155. Para esto se utilizaron frascos de 500 mL de capacidad, los cuales contenían 100 mL de medio de cultivo líquido YM a pH 4,5. La concentración inicial de levaduras fue ajustada inicialmente en cada frasco a 1×10^7 células mL^{-1} . Las levaduras se incubaron a 25 °C, con agitación constante de 150 rpm durante 24 horas.

Finalizado el período de incubación se determinaron las siguientes variables: concentración de células, producción de biomasa, contenido de azúcares reductores y proteína bruta en el medio de cultivo y contenido de proteína bruta, carbohidratos y selenio en las levaduras. Para medir la concentración final de células se usó la técnica de conteo en cámara de Neubauer. La biomasa producida se determinó secando en un liofilizador Labconco durante 96 horas muestras de biomasa, de peso inicial conocido y pesando el residuo final. De cada frasco, se analizó el sobrenadante en cuanto a su contenido de azúcares reductores mediante el método de Somogy (1952) y de proteína extracelular por el método de Lowry *et al.* (1951). También se analizó la biomasa microbiana por su contenido de proteína por el método de Lowry *et al.* (1951) y de carbohidratos totales por el método de la antrona (Laurentin y Edwards, 2003). Para determinar el contenido de selenio disponible se realizó una extracción de la fracción soluble e insoluble en agua en los extractos de levaduras. Estas dos fracciones fueron sometidas a hidrólisis ácida por microondas y se cuantificó el selenio en los hidrolizados por espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (Chassaigne *et al.*, 2002).

Análisis estadístico. En el estudio las variables analizadas fueron el contenido de selenio, carbohidratos totales y proteína en la biomasa producida y el contenido de azúcares reductores y de proteína en el sobrenadante obtenido al final de la incubación. La información de la concentración y utilización de nutrientes de los 104 aislados se analizó mediante el procedimiento Cluster (algoritmo de Ward) del SAS (1989), el cual minimiza la varianza dentro de los grupos y la maximiza entre los grupos. Mediante este procedimiento se distribuyeron los aislados de levadura en cinco grupos. La variable producción de biomasa únicamente se tuvo en cuenta en el análisis descriptivo, debido a que presentó una correlación directa con todas las demás variables aportando, por tanto, información redundante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de una longitud de onda para medir el crecimiento espectrofotométricamente. No hubo diferencias entre las tres longitudes de onda, a pesar de que la absorbancia a 570 y 620 nm fue en promedio 5% más baja que la observada a 540 nm.

En los siguientes experimentos de este estudio, se leyeron las muestras a 540 nm, una longitud de onda comúnmente utilizada para la determinación de crecimiento por el método de turbidimetría (Hernández *et al.*, 1979, Ariza y González, 1997).

Determinación del efecto de la temperatura, el pH y el tiempo de incubación sobre el crecimiento de tres aislados de levaduras.

Hubo variabilidad en el crecimiento de los tres aislados de levadura cuando se usaron en medios de cultivo de diferente valor de pH (Figura 1), observándose mayor crecimiento a pH 4,5 que en los otros cinco valores de pH evaluados ($P < 0,05$). Esto corrobora los resultados de otros estudios donde se ha reportado que 4,5 es un pH adecuado para el crecimiento de levaduras (Hernández *et al.*, 1979, Ariza y González, 1997). Por su parte, García (2002) reportó que en medios alcalinos se promueve el crecimiento de bacterias y se desfavorece el de las levaduras. Al comparar entre aislados, el crecimiento del aislado 155 fue en promedio menor al del 068 ($P < 0,05$) y el del aislado 042 fue similar al de los otros dos aislados ($P > 0,05$).

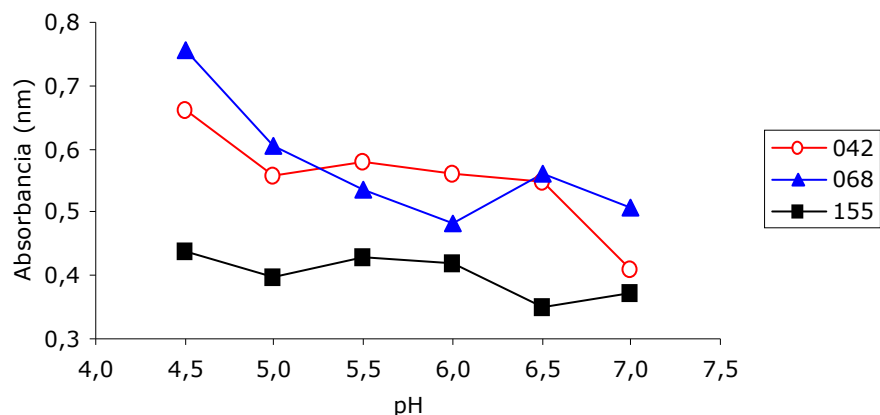


Figura 1. Determinación del efecto del pH en el medio de cultivo sobre el crecimiento de tres aislados (042, 068 y 155) de levaduras nativas.

Para corroborar estas observaciones se realizó un experimento adicional donde se midió la cinética de crecimiento del aislado 042 en medio de cultivo a pH 4,5 y 5,5 (Figura 2). En el análisis de la cinética de crecimiento, se utilizó el modelo logístico cuyo ajuste a los datos experimentales fue adecuado ($r > 0,999$ en ambos casos). Durante las primeras 10 horas de

incubación, hubo mayor crecimiento a pH de 4,5; siendo este al menos 1,35 veces el observado a pH 5,5 ($P < 0,05$). Sin embargo, el crecimiento se igualó hacia las 15 horas y a partir de ese momento no se observaron diferencias entre cultivos hasta el final de la incubación ($P > 0,05$). A pH 4,5; la duración de la fase Lag fue menor que a pH 5,5; corroborando la

mayor adaptación del aislado a pH 4,5. Estos resultados sugieren que 4,5 es un valor de pH adecuado para las levaduras evaluadas en este estudio.

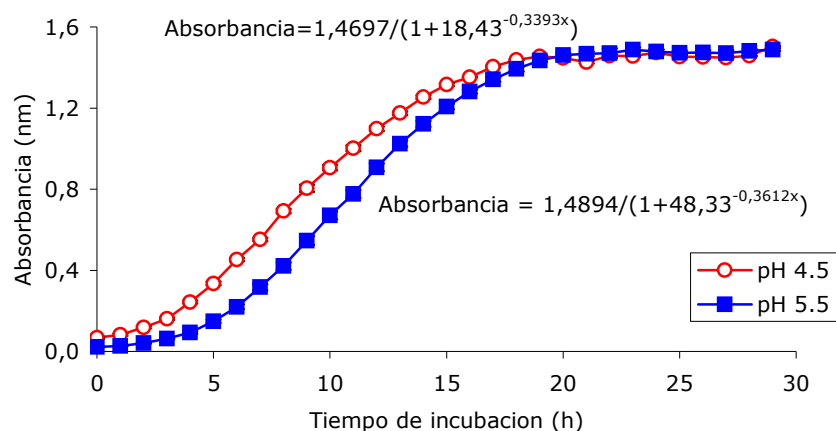


Figura 2. Cinética de crecimiento del aislado de levadura 042 en medio de cultivo a dos valores de pH, 25 °C y 30 horas de incubación.

El efecto de temperatura de crecimiento se muestra en la Figura 3. Durante las primeras 24 h de incubación el crecimiento de los aislamientos fue mayor cuando la incubación se llevó a cabo a 25 °C ($P < 0,05$). Además, en las cinéticas de crecimiento a 30 y 35 °C hubo una fase Lag mayor que la observada a 25 °C, donde el crecimiento fue inmediato. Durante las primeras 18 horas de incubación, el crecimiento observado a 25 °C fue mayor que a las otras temperaturas, en las que solo se alcanzó entre el 64 y 69% del crecimiento

observado con 25 °C. Las levaduras crecidas a 25 °C alcanzaron su fase estacionaria hacia las 21 h, lo que permite realizar experimentos mas cómodamente que a las otras temperaturas evaluadas. Estas observaciones están de acuerdo con las mencionadas por Tovar *et al.* (2000). Con base en estas observaciones la temperatura de incubación escogida para los siguientes experimentos fue de 25 °C. A su vez, como se muestra en las Figuras 2 y 3, el aislado 042 alcanzó su fase estacionaria a las 24 horas.

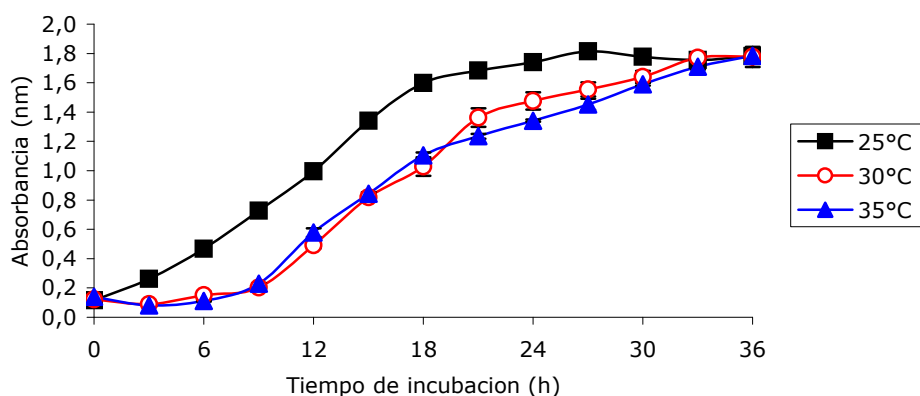


Figura 3. Cinética de crecimiento del aislado de levadura 042 a diferentes temperaturas de crecimiento en un medio de cultivo a pH 4,5 durante 36 horas de incubación.

Evaluación de la producción de biomasa y el contenido de nutrientes seleccionados en una colección de levaduras nativas y comerciales.

La producción de biomasa varió entre 0,97 y 4,44 mg de células secas mL⁻¹ de medio de cultivo. Las levaduras de mayor producción de biomasa fueron las nativas, con las levaduras comerciales ocupando los lugares 24, 72, 80 y 84 en producción de biomasa. Cotes *et al.* (2004) expresaron que el aislado 027 al ser crecido en medio MLXOM en un reactor de 20 L a 30 °C durante 24 horas, tuvo rendimientos en biomasa de 2,35 mg•mL⁻¹. Esto sugiere que al menos el 20% de los aislados de levadura nativos evaluados en el presente estudio poseen capacidades de producción de biomasa promisorias desde el punto de vista de la producción industrial.

El contenido de selenio varió entre 1,20 a 2,68 µg L⁻¹ de medio de cultivo. El selenio es un elemento traza esencial con un papel importante en la actividad de las enzimas relacionadas con la protección antioxidante y el metabolismo de la hormona tiroidea (Rayman, 2000). Además existe un creciente cuerpo de evidencia que señala que un consumo adecuado de Se es efectivo para reducir el riesgo de cáncer en animales y humanos (Clak *et al.*, 1996; Rayman *et al.*, 2003). Los contenidos de selenio encontrados en este estudio son bajos, lo que obedeció al bajo contenido de selenio en el medio de cultivo utilizado. Cuando las levaduras crecen en medios enriquecidos con selenio pueden llegar a contener entre 1000 a 2000 µg de Se g⁻¹ de levadura (Schrauzer, 2001, Hinojosa *et al.*, 2006) dada su alta capacidad de bioabsorción de metales (Wang y Chen, 2006).

Los contenidos de carbohidratos totales y de proteína microbiana variaron entre 0,59 y 2,95 y entre 0,11 y 0,96 mg•mL⁻¹ de medio de cultivo, respectivamente. Con base en los datos experimentales se calcularon los rendimientos de biomasa, expresados como gramos de biomasa de levadura por gramo de azúcar consumido. Estos valores variaron desde 0,101 a 0,436 g biomasa/ g azúcar consumido. La velocidad de producción de biomasa varió desde 0,040 a 0,185 g L⁻¹ h⁻¹.

En esta fase de la experimentación la concentración inicial de los azúcares reductores en el sobrenadante fue 1,03 g/100 ml de medio de cultivo. Después de 24 h de incubación, la concentración de

carbohidratos no consumida por las levaduras estuvo entre 0,02 y 0,34 g/100 ml de medio de cultivo y el consumo promedio de carbohidratos fue del 91,6%. Se ha informado que las levaduras pueden utilizar fructosa, glucosa, maltosa, sucrosa, maltotriosa y maltotetraosa. Generalmente la levadura remueve los azúcares del medio en un orden estricto: la sucrosa es hidrolizada extracelularmente por invertasas y es la primera en ser consumida, seguida de la glucosa y fructosa, y finalmente maltosa, maltotriosa y maltotetraosa (Hammond, 2002). El factor más importante para determinar la tasa de fermentación es la tasa de utilización de la maltosa (Kedia *et al.*, 2007). La baja concentración de carbohidratos en el medio de cultivo observado al final de la fermentación en el actual experimento sugiere que la disponibilidad de azúcares fue limitante para la obtención de mayor producción de biomasa por las levaduras. En futuros experimentos con estos aislados se recomienda usar concentraciones más altas de carbohidratos para aumentar la producción de biomasa.

La concentración inicial de proteína en el medio de cultivo fue de 4,08 mg•mL⁻¹. Al final de la fermentación la concentración de proteína en el medio de cultivo varió entre 2,43 y 3,97 mg•mL⁻¹ de medio de cultivo. En promedio la retención de proteína (medida como la diferencia entre la concentración inicial y final de proteína en el medio de cultivo) fue baja (17,8% de la concentración inicial). Es difícil especular en cuanto a la causa de la diferencia entre el metabolismo de los carbohidratos y de la proteína. Las fuentes de proteína incluidas en el medio (extracto de levadura, peptona) son de adecuada disponibilidad por lo que deben descartarse problemas de asimilación de proteína por las levaduras. Es más factible creer que la baja retención de proteína obedeció a una combinación entre adecuada asimilación y alta excreción de proteína o inadecuada retención de proteína asociada a la limitada disponibilidad de energía.

Con el fin de analizar la variabilidad biológica encontrada en esta fase se realizó un análisis de correlación entre las variables estudiadas. Dicho análisis mostró la gran variabilidad biológica existente entre los aislados de levadura e hizo evidentes las diferencias en eficiencia de uso de nutrientes entre los aislados de levaduras estudiados. El coeficiente de correlación entre la

producción de biomasa y el contenido de carbohidratos totales en la biomasa fue de 0,83 (Figura 4). Este valor indica que estas variables se relacionan directamente y que a mayor producción

de biomasa los aislados de levadura tienen un mayor contenido de carbohidratos totales. En promedio a cada gramo de carbohidrato producido se asociaron 1,15 g de biomasa.

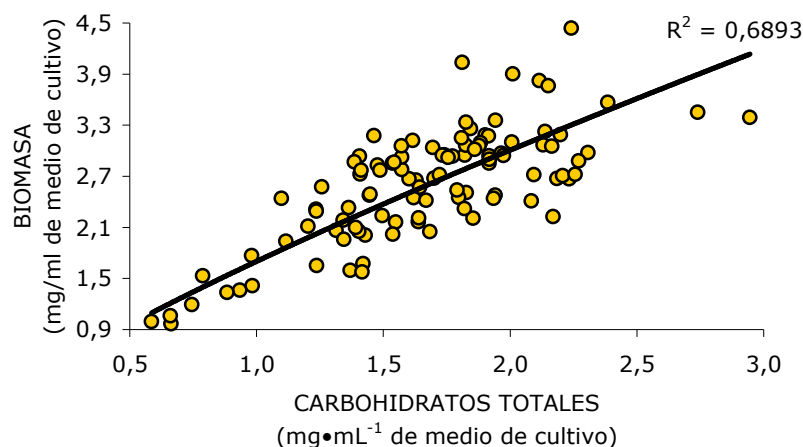


Figura 4. Correlación entre la producción de biomasa y la de carbohidratos totales en los 104 aislados de levadura evaluados.

La Figura 5 muestra la correlación entre la producción de biomasa y la producción de proteína microbiana, que tuvo un coeficiente de correlación de 0,73; por lo que a mayor producción de biomasa,

mayor producción de proteína microbiana. En promedio, la producción de cada gramo de proteína microbiana estuvo asociada con la producción de 2,02 g de biomasa.

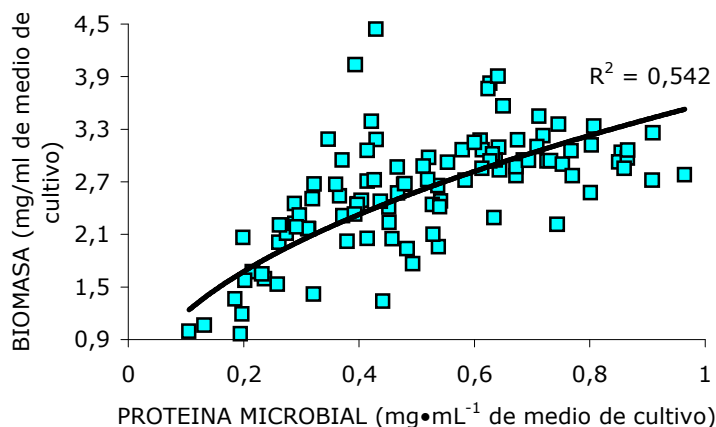


Figura 5. Correlación entre la producción de biomasa y la de proteína microbiana en los 104 aislados de levadura evaluados.

Por su parte, no se existió correlación ($P > 0,05$) entre el contenido de selenio y las demás variables

evaluadas en este estudio. Cabe recordar que el medio utilizado en estos experimentos no fue

enriquecido con selenio, lo que seguramente limitó la expresión de la capacidad de bioabsorción de selenio por los aislados evaluados. Las levaduras están entre un grupo de organismos con alta capacidad de bioabsorción de metales, incluyendo los pesados, y pueden efectivamente secuestrar rápida y eficientemente iones metálicos a partir de soluciones muy diluidas (Wang y Chen, 2006). Dado el alto valor agregado de la absorción de selenio sobre el valor de las levaduras como suplemento para humanos (Schrauzer, 2003; Clark *et al.*, 1996) y animales (Newbold *et al.*, 1996), futuros estudios deberán ocuparse en identificar estas diferencias en cepas de levaduras colombianas.

La correlación de la variable carbohidratos en el sobrenadante con todas las otras variables tuvo coeficientes muy bajos. Esto se debió a que casi todos los microorganismos consumieron casi totalmente los azúcares disponibles en el medio de cultivo, lo que probablemente afectó su crecimiento como se discutió anteriormente.

Finalmente, en las correlaciones realizadas con la variable proteína en el sobrenadante, se observaron coeficientes de correlación de 0,52 con la variable producción de biomasa y de 0,51 con la variable producción de proteína microbiana. Los valores de ambas variables aumentaron al aumentar el consumo de nitrógeno por las levaduras.

El análisis estadístico de los resultados permitió identificar cuatro componentes (producción de biomasa y contenido de selenio, carbohidratos y proteína en la biomasa de las levaduras), cuya variabilidad explicó el 92% de la variabilidad total observada. Con base en esos cuatro componentes, el procedimiento Cluster del programa SAS (1989) distribuyó los 104 aislados en cinco grupos, cuyas medias para cada uno de los componentes evaluados se muestra en la Tabla 1. Un rápido análisis de los datos muestra que las levaduras con las mejores características se encuentran en los grupos 2 y 4, de allí que la selección de aislados promisorios se centró en ambos grupos.

Tabla 1. Valores promedio de la producción de biomasa y contenido de nutrientes en los 5 grupos resultantes del análisis de conglomerados de las 104 cepas de levaduras evaluadas, Fase 2.

Variable	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Biomasa, mg•mL ⁻¹	1,87	2,93	2,85	2,82	2,13
Selenio, µg L ⁻¹	1,74	2,64	1,69	1,98	1,57
Carbohidratos totales, mg•mL ⁻¹	1,26	1,76	1,68	2,13	1,47
Proteína microbiana, mg•mL ⁻¹	0,31	0,57	0,67	0,46	0,32
Cepas por grupo, n	21	21	21	20	21

Los diez aislados identificados como promisorios para avanzar en la caracterización de su potencial probiótico y/ o prebiótico en ensayos con animales se muestran en la Tabla 2. Es importante resaltar las

bondades observadas en los aislados nativos en cuanto a producción de biomasa y contenido de carbohidratos y proteína.

Tabla 2. Producción de biomasa y contenido de nutrientes en las 10 levaduras sobresalientes de acuerdo al análisis de conglomerados, teniendo en cuenta las variables contenido de selenio y carbohidratos totales y producción de biomasa. Se incluye la levadura comercial de mayor crecimiento. Las variables son mostradas sobre mL o sobre litro de medio de cultivo al final de la incubación.

Levadura	Criterio de selección	Biomasa, (mg•mL ⁻¹)	Selenio (µg L ⁻¹)	Carbohidratos microbiales totales (mg•mL ⁻¹)	Proteína microbiana (mg•mL ⁻¹)	Velocidad de producción de biomasa, (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Factor de rendimiento (g L ⁻¹ h ⁻¹)
Com1	Comercial	3,06	2,36	1,57	0,41	0,127	0,297
039	Selenio	3,07	2,61	2,13	0,58	0,128	0,299
165	Selenio	3,09	2,40	1,88	0,64	0,129	0,303
140	Selenio	3,34	2,64	1,83	0,81	0,144	0,327
118	CHOs Totales	3,19	1,94	2,20	0,35	0,133	0,311
155	CHOs Totales	3,39	1,80	2,95	0,42	0,139	0,332
042	CHOs Totales	3,45	2,05	2,74	0,71	0,141	0,336
077	Biomasa	3,76	2,68	2,15	0,62	0,157	0,369
008	Biomasa	3,82	2,67	2,12	0,63	0,159	0,373
196	Biomasa	4,44	2,67	2,24	0,43	0,185	0,436
Mínimo	-----	0,97	1,20	0,59	0,11	0,040	0,095
Máximo	-----	4,44	2,68	2,95	0,96	0,185	0,436
Promedio	-----	2,61	1,88	1,67	0,51	0,109	0,255
CV, %		24,32	19,14	25,60	39,43	24,32	24,16

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Probablemente debido a la biodiversidad existente en la población estudiada, hubo diferencias en la eficiencia de asimilación y utilización de nutrientes entre los aislados de levadura evaluados. En consecuencia, los aislados variaron en crecimiento, consumo de proteína y contenido de carbohidratos, proteína y selenio. Esta variabilidad en contenido de nutrientes posibilita la identificación de aislados de levaduras para diferentes usos, tales como la producción de suplementos proteicos o la de productos probióticos y/o prebióticos.

Aunque en este ensayo, el mayor crecimiento de las levaduras se obtuvo a pH 4,5; 25 °C de temperatura y 24 horas de fermentación, lo que está en concordancia con otras citas en la literatura, es de esperar que dependiendo de la levadura, las condiciones óptimas de crecimiento puedan diferir de las aquí comentadas. En consecuencia, para aumentar la tasa de crecimiento de alguna levadura

en particular, deben realizarse las evaluaciones de pH, temperatura y tiempo de incubación, a fin de asegurar que se usen las adecuadas para dicho aislado.

Las diez levaduras seleccionadas por características superiores de crecimiento, producción de proteína y acumulación de carbohidratos y selenio, deben ser evaluadas por su potencial prebiótico y probiótico en estudios *In vivo* con animales monogástricos y bovinos jóvenes. Estos experimentos *In vivo* son requeridos por varias razones: (1) Determinar la posible patogenicidad de los aislados seleccionados, pues es reconocido que algunas levaduras como *Cryptococcus neoformans* y varias del género *Candida* son organismos oportunistas causantes de enfermedades en humanos y animales (Hurley *et al.*, 1987); (2) Determinar el impacto de la inclusión de las levaduras seleccionadas en las condiciones colombianas, entre las que se deben mencionar temperatura, humedad relativa y dieta, factores que afectan el crecimiento de organismos patógenos o

alteran la capacidad del animal para tolerarlos y (3) Determinar niveles óptimos de inclusión de levaduras en la dieta y/o identificar puntos críticos en la vida de los animales en los cuales dicha inclusión resulta benéfica.

En el presente estudio se evaluó solamente una parte de la población de levaduras existente en Colombia. Por ejemplo, en el Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico de CORPOICA se encuentran conservadas mas de 230 accesiones, por lo que se recomienda que con los aislados aun no caracterizados, se adelanten estudios similares al acá reportado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a COLCIENCIAS por la financiación del proyecto "Desarrollo de productos derivados de la fermentación de levadura para mejorar la eficiencia nutricional en monogástricos y/o rumiantes en condiciones tropicales", Código 7106-07-14967, Convenio 401-2003, en cuya primera fase se originaron los resultados aquí reportados. Especial reconocimiento a Dora Elisa Sánchez, Marilce Castro y Elizabeth Martín, Investigadoras del Programa de Fisiología y Nutrición Animal de CORPOICA, por su colaboración en la realización de este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

Aguirre, A. 2003. Obtención de un biopreparado a partir de cepas nativas de levadura para ser utilizado en animales monogástricos. Universitas Scientiarum. Revista de la Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana 8 (2): 69-74.

Ariza, B.E. y L.M. González. 1997. Producción de proteína unicelular a partir de levaduras y melaza de caña de azúcar como sustrato. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá D.C.

Castro, M. y F. Rodríguez. 2005. Levaduras: Probióticos y prebióticos que mejoran la producción animal. Revista CORPOICA 6 (1): 26-38.

Chassaigne, H., C.C. Chery, G. Bordin and A.R. Rodríguez. 2002. Development of new analytical methods for selenium speciation in selenium-

enriched yeast material. J. Chromatogr 8, 976 (1-2): 409-422.

Clark, L.C., G.F. Combs, B.W. Turnbull, E.H. Slate, D. Chalker, J. Chow, L.S. Davis, R.A. Glover, G.F. Graham, E.G. Gross, A. Krongrad, J.L. Leshner, H.K. Park, B.B. Sanders, C.L. Smith and J.R. Taylor. 1996. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. J. Am. Med. Assoc. 276: 1957-1963.

Corredor, I.C. 2002. Evaluación de dos métodos de conservación sobre diferentes microorganismos con interés en control biológico. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá D.C.

Cotes, A.M., L.F. Villamizar y P.G. García. 2004. Las levaduras como alternativa de control biológico de fitopatógenos en poscosecha de frutas y hortalizas. pp. 9-11. En: Laboratorio de Control Biológico. Programa de Manejo Integrado de plagas. C.I. Tibaitatá, Mosquera (Cundinamarca).

Elmer, G.W. and L.V. Mcfarland. 2001. Biotherapeutic agents in the treatment of infectious diarrhea. Gastroenterol Clin. North. Am. 30: 837-854.

FEDESA. 1999. Antibiotics for animals. pp. 17-22. In: A FEDESA perspective on antibiotics, animal health and the resistance debate. European Federation of Animal Health. Rue Defacqz, Brussels.

García, S.R. 2002. Las levaduras para la alimentación de los porcinos (*Saccharomyces cerevisiae*). En: Comunidad de Negocios Internacionales Relacionados con la Producción Animal. <http://www.Engormix.com>; consulta: agosto 2007.

Gismondo, M.R., L. Drago and A. Lombarda. 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. International Journal of Antimicrobial Agents 12: 287-292.

Hammond, J. 2002. Yeast growth and nutrition. pp. 75-85. In: Katherine S, editor. Brewing yeast fermentation performance. Blackwell Science. London.

- Hernández, E., E. Maza y N. Lozano. 1979. Producción de proteína celular mediante cultivo continuo de levadura en suero de leche desproteinizada. Revista de la Facultad de Agronomía, Venezuela 5(2): 468-477.
- Hilliam, M. 2003. Future for dairy products ingredients in the functional foods market. Aus. J. Dairy. Technol. 58: 98-103
- Hinojosa, L., J. Ruiz, J.M. Marchante, J.I. García and A. Sanz. 2006. Selenium bioaccessibility assessment in selenized yeast after "In vitro" gastrointestinal digestion using two-dimensional chromatography and mass spectrometry. Journal of Chromatography 1110: 108-116.
- Hurley, R., J. de Louvois and A. Mulhall. 1987. Yeast as human and animal pathogens, p. 207-281. In: Rose A.H. and J.S. Harrison (eds.). The yeasts, vol. 1. Academic Press Inc. New York.
- Kedia, G., R. Wang, H. Patel and S.S. Pandiella. 2007. Use of mixed cultures for the fermentation of cereal-based substrates with potential probiotic properties. Process Biochemistry 42: 65-70
- Kellems, R.O., A. Lagerstedt and M.V. Wallentine. 1990. Effect of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract or *Aspergillus oryzae* plus yeast culture plus mineral and vitamin supplement on performance of Holstein cows during a complete lactation. J. Dairy Sci. 73: 2922-2928
- Laurentin, A. and C.A. Edwards. 2003. A microtiter modification of the anthrone-sulfuric acid colorimetric assay for glucose-based carbohydrates. Anal. Biochem 315(1): 143-145.
- Lowry, O.H., W.J. Rosebrough, A.L. Far and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Martin, S.A., and D.J. Nisbet. 1992. Effect of direct-fed microbials on ruminal microbial fermentation. J. Dairy Sci. 75:1736-1744.
- Newbold, C.J., R.J. Wallace and F.M. McIntosh. 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. Brit. J. Nutr. 76:249-261.
- Nurmi, E. and M. Rantala. 1973. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. Nature, 241: 210-211.
- Piva, G., S. Belladonna, G. Fusconi and F. Sicbaldi. 1993. Effects of yeast on dairy cow performance, ruminal fermentation, blood components and milk manufacturing properties. J. Dairy Sci. 76: 2717-2722.
- Rayman, M.P. 2000. The importance of selenium in human nutrition. The Lancet 356: 233-241.
- Rayman, M.P., P. Bode and C.W.G. Redman. 2003. Low selenium status is associated with the occurrence of pregnancy disease preclampsia in women from the United Kingdom. Am. J. Obstet. Gynecol 189: 1343-1349.
- Sánchez, N.M., R.F. Schwan, M. Borges and C. Medina. 2000. The rising power of yeast in science and industry. Tenth international symposium on yeast. The Netherlands.
- SAS (Statistical Analysis System Institute Inc.) 1989. SAS/STAT user's guide version 6, 4th ed. Vol. 2. SAS Institute Inc. Cary, N.C.
- Schrauzer, G.N. 2001. Commentary: Nutrition selenium supplements: Product types, quality, and safety. J. Am. College of Nutr. 20:1-4.
- Schrauzer, G.N. 2003. The nutritional significance, metabolism and toxicology of selenomethionine. Adv. Food Nutr. Res. 47: 73-112.
- Somogy, M. 1952. Notes on sugar determination. Journal of Biological Chemistry 195:19-23.
- Tovar, D., J.L. Zambonino, C. Cahu, F.J. Gatesoupe, y R. Vázquez. 2000. Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces. pp. 19-22. En: Memorias. Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Yucatán, México.
- Wang, J. and C. Chen. 2006. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. Biotechnology Advances 24: 427-451.

Williams, P.E.V., C.A.G. Tait, G.M. Innes and C.J. Newbold. 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. J. Anim. Sci. 69: 3016–3026.

Wohlt, J.E., A.D. Finkelstein and C. H. Chung. 1991. Yeast culture to improve intake, nutrient digestibility, and performance by dairy cattle during early lactation. J. Dairy Sci. 74: 1395–1400.

Yoon, I.K., and M.D. Stern. 1996. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* cultures on ruminal fermentation in dairy cows. J. Dairy Sci. 79:411–417.

Zelenka, L. and E. Fajmonova. 2005. Effect of age on utilization of selenium by chickens. Poultry Science 84: 543-546.